

THE PATENTS ACT 1977

IN THE MATTER OF

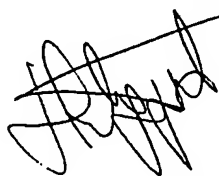
EUROPEAN PATENT (UK)

No. 0484472 of

Dr. Hans Sigrist & al.

I, JOHN EDWARD FITZGERALD, B.A., of Frank B. Dehn & Co.,
179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL,
hereby declare that I am conversant with the English
and German languages and that to the best of my
knowledge and belief the attached document is a true
and correct translation, made by myself, of the original
text of the granted European Patent (UK) specified
above.

Signed this 14th day of October 1997



J. FITZGERALD

65560.597

Description of the invention

5 The invention relates to a process for the light-induced
immobilisation of biomolecules in monomolecular layers,
using photoactivatable arylazides or diazirines as
molecular adhesives. Triggered by the rapid development
and miniaturisation of bioanalytical methods on the one
10 hand, and advances in biosensor technology on the other
hand, there is lively interest in an increased
understanding of the reciprocal effect between
biomolecules and surfaces of an organic-synthetic or
inorganic nature. Of equal importance is the development
15 of methods for the effective, chemically stable coupling
of biomolecules to carrier materials, wherein firstly
neither chemically-pretreated nor extreme (coupling)
reaction conditions must be set out. Analytic/diagnostic
processes and the production of surface-active bio-
20 sensors require suitable anchoring of the active
materials in monomolecular layers. Since the surfaces of
many carrier materials which have hitherto been used for
this purpose have no, or few, suitable chemically
reactive functions, biomolecules were hitherto mostly
25 bound to pre-treated carrier materials via group-
specific thermo-chemical reactions over the whole
surface. Chemical immobilisations of this kind are
basically possible. However, the process requires the
presence of functional groups which can be specifically
30 activated. Moreover, monomolecular covering of surfaces
can only be facilitated over the whole surface using
processes which have hitherto been used (bulk
processes).

35 Similar processes are known from the prior art; Lingwood
[C. A. Lingwood, Journal of Lipid Research 25, (1984)
1010] describes the production of matrices with a

specific affinity with respect to glycolipids using heterobifunctional, crosslinking agents. To facilitate this, a technique is used, whereby a photoactivatable, heterobifunctional crosslinking reagent is used for
5 covalent immobilisation of glycolipids on agarose or specially-derived carriers made from glass.

An inert carrier would not be considered for this process, but rather - along with aminohexylagarose -
10 glasses functionalised via amino groups, such as e.g. aminopropyl glasses, or aminophenyl glasses.

Further derivatisation of the amino matrix occurs by crosslinking the amino groups of the correspondingly-
15 derivatised glass, either with hydroxysuccinimidylazidobenzoate (HSAB) or with methyl-4-azido-benzimidate (MABI). The glycolipids which are to be bound are - after the matrix has been washed - then in a second step added in solution and are chemically
20 covalently bound.

In comparison, US patent 4 597 999 discloses a method for the covalent coupling of two molecular species, in a general sense. In particular, the process described in
25 this document is used for the covalent binding of ligands, which have hydrocarbon groups, to a corresponding matrix. In addition, the process described in this document requires that the matrix in the carrier material has free amino groups [column 3, lines 21 ff.].
30 Named examples are, amongst others, aminophenyl and aminopropyl glasses.

With the process as described in US 4 597 999, in the first step the matrix containing the amino groups is converted with a heterobifunctional crosslinker - such as e.g. 4-methylazidobenzimidate or N-hydroxysuccinimidylazidobenzoate - in order to provide the activated matrix required for this process. In a second reaction step, the coupling reaction finally occurs with the desired ligands [column 4, lines 4 ff.].

Furthermore, in US patent 3 959 078 a process of enzyme immobilization is described whereby enzymes are immobilised using a thermochemical and a photochemical step. In the first step, a bifunctional agent which has a thermochemically and a photochemically activatable substituent in its original state, is bound in a thermochemical step to a suitably derivatised surface of a carrier material. In a further step, the carrier material which is derivatised in this way is activated photochemically, and the desired enzyme is thus bound within the framework of a photochemical step.

In order to carry out the whole process, it is thus a basic prerequisite that the carrier material is derivatised in a suitable form.

Whilst the bifunctional agent reacts in the dark with the amino group on the surface of the carrier material in the first thermochemical step, the actual immobilisation of the enzyme takes place in a second photochemical step.

In comparison, the European disclosure of publication
no. 0 175 973 discloses a carrier material for use in
immune determination, where a reaction partner of the
immunologic reaction is covalently bound to the carrier
5 material via heterobifunctional photoactivatable
compounds, of which a functional group is formed by an
acylacid group.

As can be taken from the only example of this disclosure
10 document, the process disclosed here is likewise a
multi-step process, where the protein is firstly bound
to a carrier material with a so-called "bridge-builder"
- such as N-succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenyl-
amino)hexane. After the additional washing steps, the by
15 this time carrier-bound protein is converted via
Lohmant's reagent.

This second bridge-builder reacts with the N-hydroxy-
succinimide ester as a functional group covalent with
20 the protein bound to the carrier. After further washing
steps, the carrier-bound protein which has been
derivatised in this way can be incubated with suitable
antibodies, which are herein bound to the protein via
their constant part.

25 Furthermore, a process can be taken from a report in the
Patent Abstracts of Japan [vol. 13, no. 174 (C-
589) (3522) of 25th April 1989], wherein a film, which is
essentially water insoluble, made of an organic
30 material, which contains a precursor-molecule for the
formation of a nitrene or carbene, is used for the
purpose of immobilisation.

This film is formed on a substrate and in a second step is irradiated with light in the presence of a bioactive protein, which leads to immobilisation of the protein on the organic film material. From this abstract it follows
5 that a two-step procedure is likewise necessary for carrying out this process.

The objective of the present invention is to bind
10 macromolecular substances, in particular biomolecules, to chemically-"inert" surfaces in a regio-specific and topologically-orientated manner. Methods are to be detailed which permit immobilisation of molecular layers of biologically-active active substances (protein
15 molecules, nucleic acids, carbohydrates, lipids, low-molecular weight active substances) via suitable crosslinkers to solid phases (carrier materials) of different chemical nature. For covalent immobilisation, photoactivatable crosslinker molecules are to be used. Photoactivatable reagents are superior to thermochemical
20 crosslinking reactions because the reaction can be triggered photo-optically or selected via targeted application of electrical energy with regard to location and dimensions, and the coupling reaction time can be controlled.

25 The objective is fulfilled by means of the process according to the invention, facilitating the photochemical immobilisation of biomolecules onto "inert" carriers in onestep. The covalent binding of
30 the molecules to the carriers takes place via photogenerated carbenes or nitrenes. Carbenes, like nitrenes, are extremely chemically-reactive intermediate products. They are suitable for covalently binding biomolecules via insertion reactions in C-H, C-C, C = C,
35 N-H, O-H and S-H bonds. For this reason, the resulting wide-ranged reaction spectrum of the photogenerated carbenes and nitrenes exceeds the thermochemical

modification reactions with regard to the required reaction conditions. The smallest surfaces can be selectively activated and covered with monomolecular biomolecules by the use of laser light sources or by
5 applying the required energy to activate the reactive functions.

The photochemically-induced immobilisation of ligands takes place by using a multiply-derived linker molecule
10 in a single reaction step.

THE ONE-STEP COUPLING PROCESS CONSISTS OF THE FOLLOWING STEPS:

15

1. A linker molecule (e.g. a synthetic or natural polymer) is multiply derived with heterobifunctional, photoactivatable crosslinker molecules (e.g. 3-(trifluoromethyl)-3-(m-
20 isothiocyanophenyl)diazirine or 3-(trifluoromethyl)-3-(m-aminophenyl)diazirine, p-azidophenyl-isothiocyanate or p-azidoaniline (= photolinker polymer).
- 25 2. The photolinker polymer is dried on the "inert" surface.
3. Biomolecules which are to be immobilised are applied in solution to the photolinker-coated
30 surface. The solvent is partially or completely removed.
4. The photoactivatable functional groups are activated and the coupling reaction triggered by
35 irradiation with light of a suitable wavelength (diazirine: 350 nm).

5. After photocoupling has taken place, non-bound ligands are removed by repeated washing of the surface (e.g. by filtration). At the same time, accompanying substances (buffer components, salts, detergents) can be exchanged or removed from the system during this step.

EXAMPLE OF AN APPLICATION OF THE ONE-STEP COUPLING PROCESS

In Immunological processes based on adsorption, existing in analogy, proteins, peptides, nucleic acids and carbohydrates can be covalently immobilised to micro-titre plates in an astonishingly simple process. The process requires no special pretreatment of the biomolecules which are to be bound, and commercial carrier materials (e.g. Nunc Maxisorp Immunoplate) can be used without pretreatment. Micro-titre plates are coated with a polymer (polypeptide) which is provided with a plurality of photoactivatable functional groups (photolinker peptide). Immobilisation takes place after exposure to light via carbene insertion. The photoactive functional groups on the suitable carrier molecule (e.g. diazirine) react simultaneously with the ligands which are to be bound (e.g. protein, DNA, immunoglobulin) and with the surface to be coated (e.g. polystyrene).

Production of the photolinker peptide

Bovine serum albumin (80 mg) is suspended in 14 ml TEA/HAc-buffer, pH 10.5 (100 ml H₂O, 100 ml acetone, 1 ml triethylamine, 1 ml acetic acid (2 M)), and is sonicated in an ultrasound bath until the solution is clear. 6 ml acetone is added to 24 µl 3-(trifluoromethyl)-3-(m-aminophenyl)diazirine (TRIMID, produced according to

Dolder et al. (1990) J. Prot. Chem. 9, 407-415) in carbon tetrachloride. The protein solution and the reagent are mixed in a 100 ml round-bottomed flask and are refluxed for one hour at 70° C. In addition, the
5 reaction solution is extracted three times, each with 30 ml heptane/ethyl acetate (6:3 v/v) and the organic phase is discarded. The aqueous phase is lyophilised overnight. The dry product is suspended in 6 ml of 0.4% (w/v) sodium dodecylsulphate in PBS (150 mM NaCl, 5 mM
10 sodium phosphate pH 7.4), and is sonicated until the solution is clear. The product is then subjected to chromatographic adsorption on Sephadex G-15 medium in PBS for further purification, and the combined protein-containing fractions are dialysed for 48 hours against
15 double-distilled H₂O (Spectrapor cut off 6000-8000). After lyophilisation the product is kept at -20° C.

Coating of the "inert" surface

20 The reaction vessels of titre plates (e.g. Nunc Immuno Modules, Polysorp F8) are each mixed with 40 µl of photolinker peptide in H₂O (corresponding to 1 nMol TRIMID-derived bovine serum albumin). The base of the
25 reaction vessel should be evenly moistened. In addition, the reaction vessels are dried in a water-jet vacuum for one hour at room temperature. These kinds of coated titre plate can be kept packed light-tight at -20° C for
30 at least three months.

Application of the biomolecules and light-induced immobilisation

35 The ligands used for immobilisation are dissolved in a chosen buffer system (e.g. 1 mg Streptavidin in 2 ml of 150 mM NaCl, 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) and

diluted until the desired final concentration (e.g. 10 to 1000 pMol Streptavidin per 30 μ l) is obtained. The reaction vessels coated with the photolinker peptide are mixed with 30 μ l ligand solution and are dried for two
5 hours in a water-jet vacuum at room temperature. To effect photo-activation, the reaction vessels are exposed to radiation with UV light rays (e.g. parallel UV (366 nm) tubes, Silvana F8T5/BLB USA, 8 Watt) for 5 - 30 minutes, and are then washed 5 times each with 150 mM
10 NaCl, 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, twice with H₂O and twice with alcohol.

Quantitative detection of immobilisation

15 The immobilisation of Streptavidin is quantified by the addition of radioactive-labelled [¹⁴C]-biotin. Immunoglobulins immobilised according to the described process can be complexed with a second antibody, which
20 carries covalently-bound alkaline phosphatase, and can thus convert the substrate p-nitrophenyl phosphate. Released p-nitrophenol is quantitatively determined by absorption measurement (405 nm) in commercially-available ELISA readers. By an analogous procedure,
25 digoxigenin-labelled DNA can be bound and detected via anti-digoxigenin antibodies and alkaline phosphatase.

The covalent immobilisation of biomolecules of different classes illustrates the wide spectrum of application and
30 great potential for applying the largely standardised process. Yields of bound molecules are good. The process can be integrated without difficulty into existing analysis procedures (e.g. ELISA). Apart from the independence of functional groups of ligands and the
35 independence of limited reaction conditions, the multiple-useability of antigen-coated micro-titre plates and the easily-facilitated coupling of ligands are of

analytical and process-technological significance.

5 The process firstly represents an applicable, tested method of immobilising biomolecules, which can be further developed until it is ready for marketing. A significant advantage of the described procedure is the fact that diazirines can be handled in daylight, filtered by window-glass. Their activation occurs at 350 nm via commercially-available lighting equipment.

65560.592

Claims

- 5 1. Process for the light-induced immobilisation of biomolecules, characterised in that the biomolecules on photoactivatable carrier materials are covalently bound in one step to a chemically inert surface by irradiation with light.
- 10 2. Process according to claim 1, characterised in that protein molecules, nucleic acids, carbohydrates, lipids or low-molecular weight active substances are used as the biomolecules.
- 15 3. Process according to claim 1, characterised by binding of immunologically active molecules, particularly antibodies, antigens or haptens, with retention of their biological activity.
- 20 4. Process according to claim 1, characterised by binding of biologically active molecules, particularly enzymes or receptors, in order to produce biosensors.
- 25 5. Process according to claim 1, characterised by photochemical binding of protein molecules and/or carbohydrates to surfaces of implants in order to prevent the rejection of substances foreign to the body.
- 30 6. Process according to claim 1, characterised by binding of biomolecules, particularly protein molecules or parts thereof, in order to produce molecular switching elements.

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 484 472 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
16.07.1997 Patentblatt 1997/29

(51) Int Cl.⁶: **C12N 11/06**

(21) Anmeldenummer: **91906480.8**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/CH91/00085

(22) Anmeldetag: **11.04.1991**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 91/16425 (31.10.1991 Gazette 1991/25)

(54) VERFAHREN ZUR LICHTINDUZIERTEN IMMOBILISIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN AN CHEMISCH "INERTEN" OBERFLÄCHEN

METHOD FOR THE LIGHT-INDUCED IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES ON CHEMICALLY "INERT" SURFACES

PROCEDE POUR L'IMMOBILISATION INDUITE PAR LA LUMIERE DE BIOMOLECULES SUR DES SURFACES CHIMIQUEMENT "INERTES"

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL SE

(30) Priorität: **12.04.1990 CH 1253/90**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
13.05.1992 Patentblatt 1992/20

(73) Patentinhaber:
• **SIGRIST, Hans, Dr.**
CH-2007 Neuchâtel (CH)
• **KLINGLER-DABRAL, Vibhuti**
D-64347 Griesheim (DE)
• **DOLDER, Max**
CH-3012 Bern (CH)
• **WEGMUELLER, Bernhard**
CH-3012 Bern (CH)

- **KLINGLER-DABRAL, Vibhuti**
D-64347 Griesheim (DE)
- **DOLDER, Max**
CH-3012 Bern (CH)
- **WEGMUELLER, Bernhard**
CH-3012 Bern (CH)

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 175 973 **US-A- 3 959 078**
US-A- 4 597 999

- **JOURNAL OF LIPID RESEARCH**, Band 25, 1984, New York, NY (US); C.A. LINGWOOD, Seiten 1010-1012
- **PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**, Band 13, Nr. 174 (C-589)(3522), 25 April 1989
- **BIOCHEMISTRY**, Band 20, Nr. 24, Easton, PA (US); E.F. VANIN et al., Seiten 6754-6760

(72) Erfinder:
• **SIGRIST, Hans, Dr.**
CH-2007 Neuchâtel (CH)

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur lichtinduzierten Immobilisierung von Biomolekülen in monomolekularen Schichten unter Verwendung von photoaktivierbaren Arylaziden oder Diazirinen als molekulare Klebstoffe. Ausgelöst durch die schnelle Entwicklung und Miniaturisierung von bioanalytischen Methoden einerseits, und den Fortschritten der Biosensortechnik andererseits besteht ein reges Interesse, die Wechselwirkung zwischen Biomolekülen und Oberflächen organisch-synthetischer oder anorganischer Natur besser zu verstehen. Gleichwertig in der Bedeutung ist die Entwicklung von Methoden zur wirksamen, chemisch stabilen Kopplung von Biomolekülen an Trägermaterialien, wobei erstere weder chemisch vorbehandelt noch extremen (Kopplungs)Reaktionsbedingungen ausgesetzt werden müssen. Analytisch/diagnostische Verfahren und die Herstellung von oberflächenaktiven Biosensoren erfordern eine geeignete Verankerung der Wirkstoffe in monomolekularen Schichten. Weil die Oberflächen vieler, zu diesem Zweck bisher eingesetzten Trägermaterialien keine oder wenig geeignete chemisch reaktive Funktionen besitzen, wurden Biomoleküle bisher meist oberflächendeckend mittels gruppenspezifischen, thermochemischen Reaktionen an vorbehandelte Trägermaterialien gebunden. Chemische Immobilisierungen dieser Art sind grundsätzlich möglich. Das Verfahren setzt jedoch das Vorhandensein von funktionellen Gruppen voraus, die sich gezielt aktivieren lassen. Zudem kann die monomolekulare Belegung von Oberflächen mit bisher verwendeten Verfahren lediglich oberflächendeckend durchgeführt werden (bulk-Verfahren).

Aus dem Stand der Technik sind ähnliche Verfahren bekannt; so beschreibt Lingwood [C.A. Lingwood, Journal of Lipid Research **25**, (1984) 1010] die Herstellung von Matrices mit einer gewissen Affinität bezüglich Glykolipiden unter Verwendung von heterobifunktionellen, quervernetzenden Agenzien. Dazu wird eine Technik eingesetzt, bei der ein photoaktivierbares, heterobifunktionelles Quervernetzungsreagens zur kovalenten Immobilisierung von Glykolipiden auf Agarose oder speziell derivatisierten Trägern aus Glas zur Anwendung kommen.

Als Trägermaterial kommt bei diesem Verfahren kein inerte Träger in Frage, sondern - neben Aminoheylagarose - durch Aminogruppen funktionalisierte Gläser, wie z.B. sog. Aminopropylgläser oder auch Aminophenylgläser.

Die weitere Derivatisierung der Aminomatrix erfolgt durch Vernetzen der Aminogruppen des entsprechend derivatisierten Glases entweder mit Hydroxysuccinimidylazidobenzoat (HSAB) oder mit Methyl-4-azidobenzimidat (MABI). Die zu bindenden Glycolipide werden - nach dem Waschen der Matrix - erst in einem zweiten Schritt in Lösung zugefügt und chemisch kovalent gebunden.

Daneben offenbart die US-Patentschrift 4 597 999

im allgemeinen Sinn eine Methode zur kovalenten Kupplung zweier molekularer Spezies. Insbesondere findet das in dieser Patentschrift beschriebene Verfahren Verwendung zur kovalenten Bindung Kohlenwasserstoffgruppen-aufweisender Liganden an eine entsprechende Matrix. - Auch das in diesem Dokument beschriebene Verfahren stellt an das Trägermaterial die Forderung, daß die Matrix freie Aminogruppen aufweist [Spalte 3, Zeile 21 ff.]. Als Beispiele sind u.a. sog. Aminophenyl- und Aminopropylgläser genannt.

Bei dem in der US-PS 4 597 999 beschriebenen Verfahren wird im ersten Schritt die aminogruppenhaltige Matrix mit einem heterobifunktionellen Quervernetzer - wie beispielsweise 4-Methylazidobenzimidat oder N-Hydroxysuccinimidylazidobenzoat umgesetzt, um die für dieses Verfahren benötigte aktivierte Matrix bereitzustellen. - In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt letztendlich die Kupplungsreaktion mit dem gewünschten Liganden [Spalte 4, Zeile 4ff.].

Des weiteren wird in der US-Patentschrift 3 959 078 ein Verfahren zur Enzymimmobilisierung beschrieben, bei dem Enzyme unter Anwendung eines thermochemischen und eines photochemischen Schritts immobilisiert werden.

Dabei wird in einem ersten Schritt ein bifunktionelles Agens, das im ursprünglichen Zustand einen thermochemisch aktivierbaren und einen photochemisch aktivierbaren Substituenten aufweist, in einen thermochemischen Schritt an eine geeignet derivatisierte Oberfläche eines Trägermaterials gebunden. In einem weiteren Schritt wird das so derivatisierte Trägermaterial auf photochemischem Wege aktiviert und das gewünschte Enzym somit im Rahmen eines photochemischen Schritts gebunden.

Zur Durchführung des Gesamtverfahrens ist somit grundlegende Voraussetzung, daß das Trägermaterial in geeigneter Form derivatisiert ist.

Während das bifunktionelle Agens im ersten thermochemischen Schritt in der Dunkelheit mit der Aminogruppe an der Oberfläche des Trägermaterials reagiert, erfolgt erst in einem zweiten photochemischen Schritt die eigentliche Immobilisierung des Enzyms.

Daneben offenbart die Europäische Offenlegungsschrift der Publikationsnummer 0 175 973 ein Trägermaterial zur Verwendung für die Immunbestimmung, bei dem ein Reaktionspartner der immunologischen Reaktion an das Trägermaterial über heterobifunktionelle photoaktivierbare Verbindungen, deren eine funktionelle Gruppe durch eine Acylacidgruppe gebildet wird, kovalent gebunden wird.

Wie dem einzigen Beispiel dieser Offenlegungsschrift entnommen werden kann, handelt es sich auch bei dem dort offenbarten Verfahren ebenfalls um ein mehrstufiges Verfahren, bei dem das Protein zunächst mit einem sog. "Brückenbildner" - wie zum Beispiel N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexan - an ein Trägermaterial gebunden wird. Nach den anschließenden Waschschritten wird das nunmehr trägerge-

dene Protein mit Lohmant's Reagenz umgesetzt.

Dieser zweite Brückenbildner reagiert mit dem N-Hydroxy-succinimidester als funktionelle Gruppe kovalent mit dem auf dem auf dem Träger gebundenen Protein. Nach erneuten Waschschritten kann das so derivatisierte trägergebundene Protein mit geeigneten Antikörper inkubiert werden, welche hierbei mit ihrem konstanten Teil an das Protein gebunden werden.

Des weiteren kann einem Referat im Patent Abstracts of Japan [Vol. 13, No. 174 (C-589)(3522) vom 25. April 1989] ein Verfahren entnommen werden, bei dem ein im wesentlichen wasser-unlöslicher Film aus einem organischen Material, der ein Precursor-Molekül zur Bildung eines Nitrens oder Carbens enthält zur Immobilisierung eingesetzt wird.

Dieser Film wird auf einem Substrat gebildet und in einem zweiten Schritt in Gegenwart eines bioaktiven Proteins mit Licht bestrahlt, was zu einer Immobilisierung des Proteins auf dem organischen Filmmaterial führt. Aus diesem Abstract geht somit hervor, daß zur Durchführung des Verfahrens ebenfalls eine zweistufige Vorgehensweise zwingend erforderlich ist.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, makromolekulare Stoffe, insbesondere Biomoleküle, regionsspezifisch und topologisch orientiert an chemisch "inerte" Oberflächen zu binden. Es sollen Methoden aufgezeigt werden, die erlauben, molekulare Schichten von biologisch aktiven Wirkstoffen (Eiweissmoleküle, Nukleinsäuren, Kohlehydrate, Lipide, niedermolekulare Wirkstoffe) über geeignete Vernetzer an feste Phasen (Trägermaterial) von unterschiedlicher chemischer Natur zu immobilisieren. Zur kovalenten Immobilisierung sollen photoaktivierbare Vernetzermoleküle, eingesetzt werden. Photoaktivierbare Reagenzien sind den thermo-chemischen Vernetzungsreaktionen überlegen, weil die Reaktion photo-optisch oder durch gezielte Applikation elektrischer Energie bezüglich Ort und Abmessung selektioniert und die Kopplungsreaktion zeitlich kontrolliert ausgelöst werden kann.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst, das photochemische Immobilisierung von Biomolekülen an "inerten" Trägern in einem Schritt ermöglicht. Die kovalente Bindung der Biomoleküle an den Träger erfolgt über photogenerierte Carbene oder Nitrene. Carbene, ebenso wie Nitrene sind chemisch äußerst reaktive Zwischenprodukte. Sie sind geeignet, Biomoleküle durch Insertionsreaktionen in C-H, C-C, C=C, N-H, O-H, S-H Bindungen kovalent zu binden. Das resultierende breitgefächerte Reaktionsspektrum der photogenerierten Carbene und Nitrene übertrifft deshalb die thermo-chemischen Modifikationsreaktionen bezüglich den erforderlichen Reaktionsbedingungen. Durch Einsatz von Laserlichtquellen oder durch Applikation der, zur Aktivierung der reaktiven Funktionen erforderlichen Energie, können kleinste Oberflächen selektiv aktiviert und mit Biomolekülen monomolekular belegt werden.

Die photochemisch induzierte Immobilisierung von

Liganden erfolgt unter Verwendung eines mehrfach derivierten Linkermoleküls in einem einzigen Reaktionsschritt.

5 DAS ERFINDUNGSGEMÄßE, EINSTUFIGE KOPPLUNGSVERFAHREN BESTEHT AUS DEN FOLGENDEN TEILSCHRITTEN:

1. Ein Linkermolekül (z.B. ein synthetisches oder natürliches Polymer) wird mit heterobifunktionellen, photoaktivierbaren Vernetzermolekülen (z.B. 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirin oder 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-aminophenyl)diazirin, p-Azidophenylisothiocyanat oder p-Azidoanilin) mehrfach deriviert (= Photolinkerpolymer).

2. Das Photolinkerpolymer wird auf die "inerte" Oberfläche aufgetrocknet.

3. Zu immobilisierende Biomoleküle werden gelöst auf die photolinker-belegte Oberfläche aufgetragen. Das Lösungsmittel wird partiell oder gänzlich entfernt.

4. Durch Einstrahlen von Licht mit geeigneter Wellenlänge (Diazirine: 350 nm) werden die photoaktivierbaren funktionellen Gruppen aktiviert und die Kopplungsreaktion ausgelöst.

5. Nach erfolgter Photokopplung werden nicht-gebundene Liganden durch mehrmaliges Waschen der Oberfläche (z.B. durch Filtration) entfernt. Mit diesem Schritt können gleichzeitig Begleitsubstanzen (Pufferkomponenten, Salze, Detergentien) ausgetauscht oder aus dem System entfernt werden.

BEISPIEL EINER ANWENDUNG DES EINSCHRITT-KOPPLUNGSVERFAHRENS

In Analogie zu bestehenden, auf Adsorption basierenden immunologischen Verfahren können Proteine, Peptide, Nukleinsäuren und Kohlehydrate in einem erstaunlich einfachen Prozess kovalent auf Mikrotiterplatten immobilisiert werden. Das Vorgehen verlangt keine spezielle Vorbehandlung des zu bindenden Biomoleküls und handelsübliche Trägermaterialien (z.B. Nunc Immunoplate Maxisorp) können ohne Vorbehandlung verwendet werden. Mikrotiterplatten werden mit einem Polymer (Polypeptid) belegt, welches vorgängig mehrfach mit photoaktivierbaren funktionellen Gruppen bestückt wurde (Photolinkerpeptid). Die Immobilisierung erfolgt nach Belichtung durch Carben- insertion. Die am Trägermolekül angebrachten photoaktiven funktionellen Gruppen (z.B. Diazirine, reagieren gleichzeitig mit dem zu bindenden Liganden (z.B. Protein, DNS, Immunoglobulin) und mit der zu belegenden Oberfläche (z.B. Polystyrol).

Herstellung des Photolinkerpeptides

Rinderserumalbumin (80 mg) wird in 14 ml TEA/HAc-Puffer, pH 10.5 (100 ml H₂O, 100 ml Aceton, 1 ml Triethylamin, 1 ml Essigsäure (2 M)) suspendiert und im Ultraschallbad beschallt bis die Lösung klar ist. Zu 24 µl 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-aminophenyl)diazirin (TRIMID, hergestellt nach Dolder et al. (1990) J. Prot. Chem. 9, 407-415) in Tetrachlorkohlenstoff werden 6 ml Aceton gegeben. Proteinlösung und Reagens werden in einem 100 ml Rundkolben gemischt und während einer Stunde bei 70°C rückflusiert. Die Reaktionslösung wird anschliessend dreimal mit je 30 ml Heptan/Essigsäure-ethylester (6:3 v/v) extrahiert und die organische Phase verworfen. Die Wasserphase wird über Nacht lyophilisiert. Das trockene Produkt wird in 6 ml 0.4% (w/v) Natrium Dodecylsulfat in PBS (150 mM NaCl, 5 mM Natrium Phosphat pH 7,4) suspendiert und beschallt bis die Lösung klar ist. Zur weiteren Reinigung wird das Produkt an Sephadex G-15 medium in PBS chromatographiert und die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen 48 Stunden gegen H₂O bidest dialysiert (Spectrapor cut off 6000-8000). Nach Lyophilisation wird das Produkt bei -20°C aufbewahrt.

Belegen der "inerten" Oberfläche

Die Reaktionsgefässe von Titerplatten (z.B. Nunc-Immuno Module, Polysorp F8) werden mit je 40 µl Photolinkerpeptid in H₂O (entsprechend 1 nMol TRIMID-deriviertem Rinderserumalbumin) versetzt. Der Boden des Reaktionsgefässes soll gleichmässig benetzt sein. Die Reaktionsgefässe werden anschliessend am Wasserstrahlvakuum während einer Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Derart belegte Titerplatten können lichtdicht verpackt bei -20°C mindestens 3 Monate aufbewahrt werden.

Anplikation der Biomoleküle und lichtinduzierte Immobilisierung

Die zur Immobilisierung eingesetzten Liganden werden in einem beliebigen Puffersystem gelöst (z.B. 1 mg Streptavidin in 2 ml 150 mM NaCl, 5 mM Natrium Phosphat Puffer, pH 7.4) und bis zur gewünschten Endkonzentration (z.B. 10 bis 1000 pMol Streptavidin pro 30 µl) verdünnt. Die mit Photolinkerpeptid belegten Reaktionsgefässe werden mit 30 µl Ligandlösung versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur am Wasserstrahlvakuum getrocknet. Zur Photoaktivierung werden die Reaktionsgefässe 5 - 30 Minuten der Strahlung von UV Lichtquellen (z.B. parallel angeordnete UV (366 nm) Röhren, Silvania F8T5/BLB USA, 8 Watt) ausgesetzt, und anschliessend je 5 mal mit 150 mM NaCl, 5 mM Natrium Phosphat Puffer, pH 7.4, 2 mal mit H₂O und zweimal mit Alkohol gewaschen.

Quantitativer Nachweis der Immobilisierung

Die Immobilisierung von Streptavidin wird durch Zugabe von radioaktiv markiertem [¹⁴C]-Biotin quantifiziert. Nach beschriebenen Verfahren immobilisierte Immunoglobuline können mit einem zweiten Antikörper komplexiert werden, welcher alkalische Phosphatase kovalent gebunden trägt und somit das Substrat p-Nitrophenylphosphat umsetzen kann. Freigesetztes p-Nitrophenol wird durch Absorptionsmessung (405 nm) in kommerziell erhältlichen ELISA-Reader Geräten quantitativ bestimmt. In analogem Vorgehen kann Digoxigenin markierte DNS gekoppelt und über anti-Digoxigenin Antikörper und alkalische Phosphatase nachgewiesen werden.

Die kovalente Immobilisierung von Biomolekülen verschiedener Klassen illustriert das breite Anwendungsspektrum und grosse Anwendungspotential des weitgehend standardisierten Verfahrens. Die Ausbeuten an gebundenen Molekülen sind gut. Das Verfahren lässt sich uneingeschränkt in bestehende Analyseprozesse (z.B. ELISA) integrieren. Nebst der Unabhängigkeit von funktionellen Gruppen am Liganden und der Unabhängigkeit von einschränkenden Reaktionsbedingungen, sind die Mehrfachverwendung Antigen-belegter Mikrotiterplatten und die einfach durchführbare Kopplung von Liganden von analytischer und verfahrenstechnischer Bedeutung.

Das Verfahren stellt erstmals eine anwendbare, erprobte Methode zur Immobilisierung von Biomolekülen dar, die bis zur Marktreife entwickelt werden konnte. Ein bedeutender Vorteil des beschriebenen Vorgehens ist die Tatsache, dass Diazirine bei fensterglas-gefiltertem Tageslicht gehandhabt werden können. Ihre Aktivierung erfolgt bei 350 nm mit kommerziell erhältlichen Beleuchtungsgeräten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur lichtinduzierten Immobilisierung von Biomolekülen, dadurch gekennzeichnet, daß die Biomoleküle auf photoaktivierbaren Trägermaterialien durch Einstrahlen von Licht an einer chemisch inerten Oberfläche in einer Stufe kovalent gebunden werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Biomoleküle Eiweissmoleküle, Nukleinsäuren, Kohlehydrate Lipide oder niedermolekulare Wirkstoffe eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß immunologisch aktive Moleküle, insbesondere Antikörper, Antigene oder Haptene unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität gebunden werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß biologisch aktive Moleküle, insbesondere Enzyme oder Rezeptoren, zum Zweck der Herstellung von Biosensoren gebunden werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Eiweißmoleküle und/oder Kohlehydrate zur Vermeidung der Abstoßung körperfremder Substanzen photochemisch auf Oberflächen von Implantaten gebunden werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Biomoleküle, insbesondere Eiweißmoleküle oder Teile davon, zum Zweck der Herstellung von molekularen Schaltelementen gebunden werden.

Claims

1. Process for the light-induced immobilisation of biomolecules, characterised in that the biomolecules on photoactivatable carrier materials are covalently bound in one step to a chemically inert surface by irradiation with light.
2. Process according to claim 1, characterised in that protein molecules, nucleic acids, carbohydrates, lipids or low-molecular weight active substances are used as the biomolecules.
3. Process according to claim 1, characterised by binding of immunologically active molecules, particularly antibodies, antigens or haptens, with retention of their biological activity.
4. Process according to claim 1, characterised by binding of biologically active molecules, particularly enzymes or receptors, in order to produce biosensors.
5. Process according to claim 1, characterised by photochemical binding of protein molecules and/or carbohydrates to surfaces of implants in order to prevent the rejection of substances foreign to the body.
6. Process according to claim 1, characterised by binding of biomolecules, particularly protein molecules or parts thereof, in order to produce molecular switching elements.

Revendications

1. Procédé pour l'immobilisation induite par la lumière de biomolécules caractérisé en ce que les biomolécules sont fixées de manière covalente en une étape sur des matériaux supports photo-activables

par projection de lumière sur une surface chimiquement inerte.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que des molécules de protéines, des acides nucléiques, des glucides, des lipides ou des principes actifs de faible masse moléculaire sont utilisés comme biomolécules.
3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que des molécules immunologiquement actives, en particulier des anticorps, des antigènes ou des haptènes, sont fixées avec conservation de leur activité biologique.
4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que des molécules biologiquement actives, en particulier des enzymes ou des récepteurs, sont fixées en vue de la production de biocapteurs.
5. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que des molécules de protéines et/ou des glucides sont fixés par voie photochimique sur des surfaces d'implants pour éviter le rejet de substances étrangères à l'organisme.
6. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que des biomolécules, en particulier des molécules de protéines ou des parties de celles-ci, sont fixées en vue de la production d'éléments de circuits moléculaires.

THIS PAGE BLANK (USPTO)